

12-MEMBERED RING MACROLIDE COMPOUND

Patent number: JP4352783
Publication date: 1992-12-07
Inventor: MIZOGAMI KAZUTOSHI; others: 03
Applicant: TAISHO PHARMACEUT CO LTD
Classification:
- international: C07D407/06; A61K31/335; C12P17/08
- european:
Application number: JP19910223760 19910527
Priority number(s):

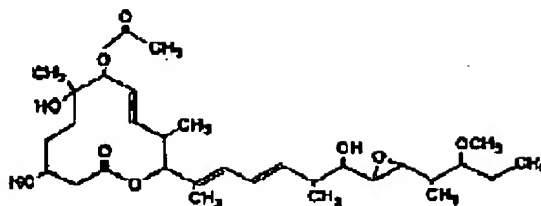
Abstract of JP4352783

PURPOSE: To provide the subject new compound having antitumor action.

CONSTITUTION: The compound of formula having the following physiological properties.

Aerobic; liquefaction of gelatin, positive; coagulation of defatted milk, negative; peptonization of defatted milk, positive; hydrolysis of starch, positive; formation of melanin-like pigment, negative; composition of menaquinone, MK-9 (H6, H8). It has the following physical and chemical properties.

Appearance, white powder; melting point, 72-76 deg.C; mass analysis, EIMS spectrum m/Z 566(M⁺); molecular formula, C₃₁H₅₀O₉; molecular weight, 566; specific rotation, [α]_D²⁵=20.0 (C=0.1, methanol); solubility, easily soluble in methanol, chloroform, acetone and ethyl acetate, scarcely soluble in n-hexane, insoluble in water; etc. The compound of formula can be produced by culturing *Streptomyces hygroscopicus* A-9561 (FERM P-12223) under aerobic condition, extracting the culture liquid with acetone and extracting the extract with ethyl acetate.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-352783

(43) 公開日 平成4年(1992)12月7日

| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|---------|-----|--------|
| C 0 7 D 407/06 | | 8829-4C | | |
| A 6 1 K 31/335 | A D U | 7252-4C | | |
| C 1 2 P 17/08 | | 2104-4B | | |
| // (C 0 7 D 407/06 | | | | |
| 303: 00 | | 7822-4C | | |

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-223760

(22) 出願日 平成3年(1991)5月27日

(71) 出願人 000002819

大正製薬株式会社

東京都豊島区高田3丁目24番1号

(72) 発明者 溝上 一敏

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内

(72) 発明者 岡崎 忠靖

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内

(72) 発明者 山岸 三千男

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 北川 富造

最終頁に続く

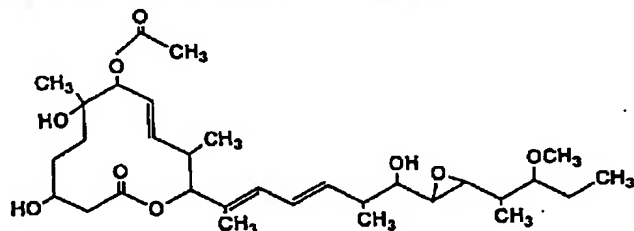
(54) 【発明の名称】 12員環マクロライド系化合物

(57) 【要約】

【目的】 抗腫瘍作用を有する新規な化合物を提供す

る。

【構成】 式



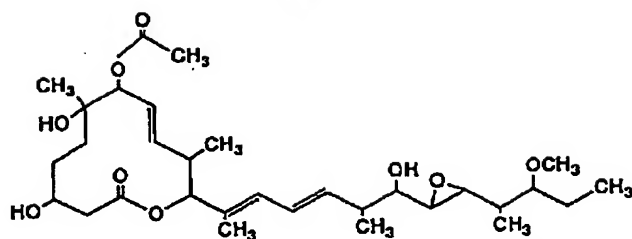
で表される化合物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

* 【化1】

*



で表される化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗腫瘍作用を有する新規な12員環マクロライド系化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】本発明の化合物と構造類似で同様の作用を持つ化合物は知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、抗腫*

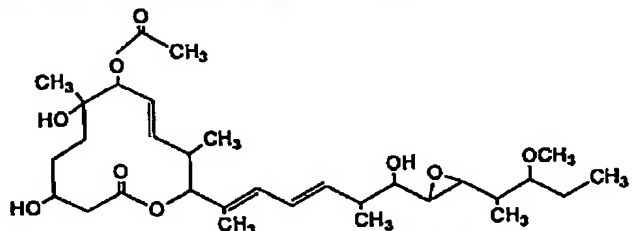
10※瘍作用を有する新規な化合物を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、制癌活性を有する新規物質を土壌分離菌の中から得るべく探索研究を重ねた結果、本発明者らの見出した特定の微生物が、癌培養細胞に対して増殖抑制作用を有する新規な生理活性物質を生産することを見出し本発明を完成するに至った。本発明は、

【0005】

【化2】



【0006】で表される化合物（以下、これをFD-895と称する。）である。FD-895を生産する菌株は、本発明者らが、沖縄県西表島で採取した土壌より新たに分離した菌株であり、微生物の名称「*Streptomyces hygrosopicus* A-9561」及び微生物寄託番号「微工研菌寄第12223号（FERM P-12223）」として、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。この菌学的性状を以下に示す。

① 形態

本菌株の栄養菌糸は合成寒天培地及び天然寒天培地においてよく発達し、不規則に分枝する。また隔壁は認められない。胞子はスターチ・無機塩寒天培地およびオート

30

ミール寒天培地などで栄養菌糸より伸長した気菌糸の先端に良好に形成される。顕微鏡で観察すると、孢子形成菌糸の分岐方法は単純分岐で、孢子は通常気菌糸の先端に螺旋状に形成される。孢子は10個以上連鎖し、表面は瘤状である。孢子の形成は、短円筒形でその大きさは、1.0~1.2 μm \times 0.8~0.9 μm である。菌核、孢子囊、鞭毛孢子は観察されない。

② 培地上での生育状態

各種培地上で28℃、14日間培養した時の肉眼による観察結果を表1に示す。

【0007】

【表1】

| 培地 | 培地上の 生育状態 | コロニー 表面の色調 | 気 菌 糸 | | 可溶性色素 |
|----------------|--------------|---------------|--------|-----|-------|
| | | | 形成 | 色調 | |
| シュウクロース・硝酸塩寒天 | 良 好 | クリーム色 | 形成せず | — | 生産せず |
| グルコース・アスパラギン寒天 | 中程度 | クリーム色 | 形成せず | — | 生産せず |
| グリセリン・アスパラギン寒天 | 良 好 | 淡 褐 色 | 中程度 | 灰白色 | 生産せず |
| スターチ・無機塩寒天※ | 良 好 | クリーム色 | 中程度 | 灰白色 | 生産せず |
| チロシン寒天 | 良 好 | 褐 色 | わずかに形成 | 灰白色 | 生産せず |
| 栄養寒天 | 中程度 | クリーム色 | 形成せず | — | 生産せず |
| イースト・麦芽エキス寒天 | 中程度 | クリーム色 | 中程度 | 灰白色 | 生産せず |
| オートミール寒天※ | 良 好 | 良 好 | 良 好 | 灰白色 | 生産せず |
| ペプトン・イースト鉄寒天 | 良 好 | クリーム色 | 形成せず | — | 生産せず |

※：ハイグロスコピックな性状を示す。

【0008】③ 生理的性質

1) 生育温度範囲

イースト・麦芽エキス培地で24.5～30℃の範囲で良好に生育する。15℃以下、38℃以上の温度範囲では生育しない。

2) 生化学的性質

- 好気性、嫌気性の区別；好気性
- ゼラチンの液化；陽性
- 脱脂乳の凝固；陰性
- 脱脂乳のペプトン化；陽性
- スターチの加水分解；陽性
- メラニン様色素の生成；陰性
- 細胞壁の型；I型
- メナキノン組成；MK-9 (H6, H8)

3) 炭素源の利用

(ブリドハム・ゴドリーブ寒天培地上)

利用する：L-アラビノース、D-グルコース、D-キシロース、D-フラクトース、シュクロース、イノシトール、ラムノース、ラフィノース、D-マンニット

【0009】以上の性状から本菌株が放線菌中、ストレプトミセス属に属することが明らかとなったので、上記諸性状をI. S. P. 「ジ・インターナショナル・ストレプトミセス・プロジェクト」、パージー著「マニュアル・オブ・シスマテック・バクテリオロジー」第4巻(1989年)及びワックスマン著「ジ・アクチノミセテス」第2巻(1961年)に報告されている多くの既知菌株と比較した結果、本菌株は、ストレプトミセス・ハイグロスコピカス (*Streptomyces hyg*

roscopicus) に最も近い性状を示していた。以上の結果より本菌株はストレプトミセス・ハイグロスコピカスと種を同じくするものと判断し、本菌株をストレプトミセス・ハイグロスコピカス A-9561と命名した。この培養液中に生産されたFD-895を単離するには、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行えば良い。すなわち各種の栄養物質を含む培地で *Streptomyces hygrosopicus* A-9561株を好氣的条件下で培養し、培養終了後、培養液をアセトン抽出し、更に酢酸エチルエステルにて抽出する。抽出されたFD-895の画分を濃縮してシロップ状とする。このシロップをシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに付すことにより、FD-895を精製単離することができる。

【0010】以上の精製法によって得られたFD-895の理化学的性質を以下に示す。

(1) 外観：白色粉末

(2) 融点：72～76℃

(3) 質量分析値：

EIMSスペクトル m/z 566 (M^+)

陽イオンFABMSスペクトル m/z 567 ($M+H$)⁺

陰イオンFABMSスペクトル m/z 565 ($M-H$)⁻

(4) EI-高分解能マススペクトル：

実測値：566.3465

理論値：566.3455 ($C_{31}H_{50}O_9$ として計

算)

(5) 分子式: $C_{31}H_{56}O_9$

(6) 分子量: 566

(7) 比旋光度:

[α]_D²⁵ = 20.0° (c = 0.1, メタノール溶液)

(8) 紫外線吸収スペクトル: メタノール溶液で測定した結果、

$$\lambda_{\max} \quad 199 \text{ nm } (\epsilon = 10245)$$

$$238 \text{ nm } (\epsilon = 24451)$$

(9) 赤外線吸収スペクトル: KBr錠中で測定したスペクトルを図1に示す。

(10) ¹H-NMRスペクトル: 重クロロホルム中、400MHzで測定したスペクトルを図2に示す。(11) ¹³C-NMRスペクトル: 重クロロホルム中、100MHzで測定したスペクトルを図3に示す。

(12) 溶剤に対する溶解性: メタノール、クロロホルム、アセトン、酢酸エチルエステルに易溶。n-ヘキサンに難溶。水に不溶。

また、FD-895はその元素分析値、分子量、紫外線スペクトル、赤外線スペクトル、¹H-NMRスペクトル、¹³C-NMRスペクトルの解析によりその構造式が化2のように決定された。

[0011]

【発明の効果】本発明の化合物は癌培養細胞に対して増殖抑制作用を有するので医薬として有用である。

[0012]

【実施例】以下、実施例および試験例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例

(1) 100ml 当りオートミール2g、グルコース2g、塩化ナトリウム0.3g、肉エキス0.3g、硫酸第二鉄0.04g、塩化マンガン(4水和物)0.04g、炭酸カルシウム0.3gを含む無菌液体培地に *Streptomyces hygroscopicus* A-9561株を接種し、28℃、96時間振とう培養した。次に内容量5Lのミニジャー2基を用いて種培地と同じ組成の無菌培地3Lに前記培養液100mlを接種し、28℃、96時間通気攪拌培養した。

(2) 培養終了後、2基分の培養液6Lをアセトン6Lで抽出した。アセトン除去した後、酢酸エチルエステル6Lで抽出を行い、無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮し褐色のシロップ状物質2.2gを得た。

(3) シロップ状物質をクロロホルムに溶解し、クロロホルムで調製したシリカゲルを充填した500mlのカラムに吸着させ、メタノールの濃度を徐々にあげながらメタノール/クロロホルム(98:2~96:4)溶液で溶出した。活性画分を合わせ、濃縮乾固し、油状物質415mgを得た。

(4) 前項の油状物質415mgを、メタノール3ml

に溶解し、メタノールで調製したセファデックスLH-20(商品名、ファルマシア社製)を充填した400mlのカラムを用いて、クロロホルム:メタノール:n-ヘキサン(5:1:5)でゲルろ過を行った。活性画分を集め、油状物質67mgを得た。

(5) 前項の薄黄色の油状物質67mgを、メタノール1mlに溶解し、メタノールで調製したトヨパール(東洋ソーダ社製)を充填した350mlのカラムに吸着させ、同一溶媒にてゲル濾過を行い、活性画分を集め、白色粉末39mgを得た。

(6) 前項の白色粉末39mgを70%メタノール2mlに溶解し、70%メタノールで調製した逆相シリカゲルのクロマトレックス(商品名、フジデビットソン社製)を充填した100mlのカラムに吸着させ、同一溶媒にて溶出し、活性画分を集め、白色粉末18mgを得た。

[0013] 試験例(各種培養細胞に対する増殖阻害作用)

(検体) 実施例で得られた白色粉末10mgをメタノールに溶解し、目的濃度となるように滅菌生理食塩水にて希釈したものを用いた。

(試験細胞)

① P388 マウス白血病

② L-1210 マウス白血病

③ HL-60 ヒト白血病

(使用した培養液)

① RPMI-1640培地

(試験方法) 前記培養液を用いて各種癌細胞を、 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 / \text{ml}$ とし、直径35mmの6穴シャーレに2mlずつ分注した。次いで目的濃度にあらかじめ希釈した検体50 μ lを、培養開始と同時に添加した。試験細胞は、37℃、5%炭酸ガス培養器内で3~4日間培養を続けた後、生細胞を測定し、試料濃度と阻害率から、IC₅₀値(50%阻害のための濃度)を求めた。

(結果) 結果は表2に示す。

[0014]

[表2]

| 癌細胞種 | IC ₅₀ 値 (ng/ml) |
|--------|----------------------------|
| P388 | 4.0 |
| L-1210 | 4.0 |
| HL-60 | 2.0 |

【図面の簡単な説明】

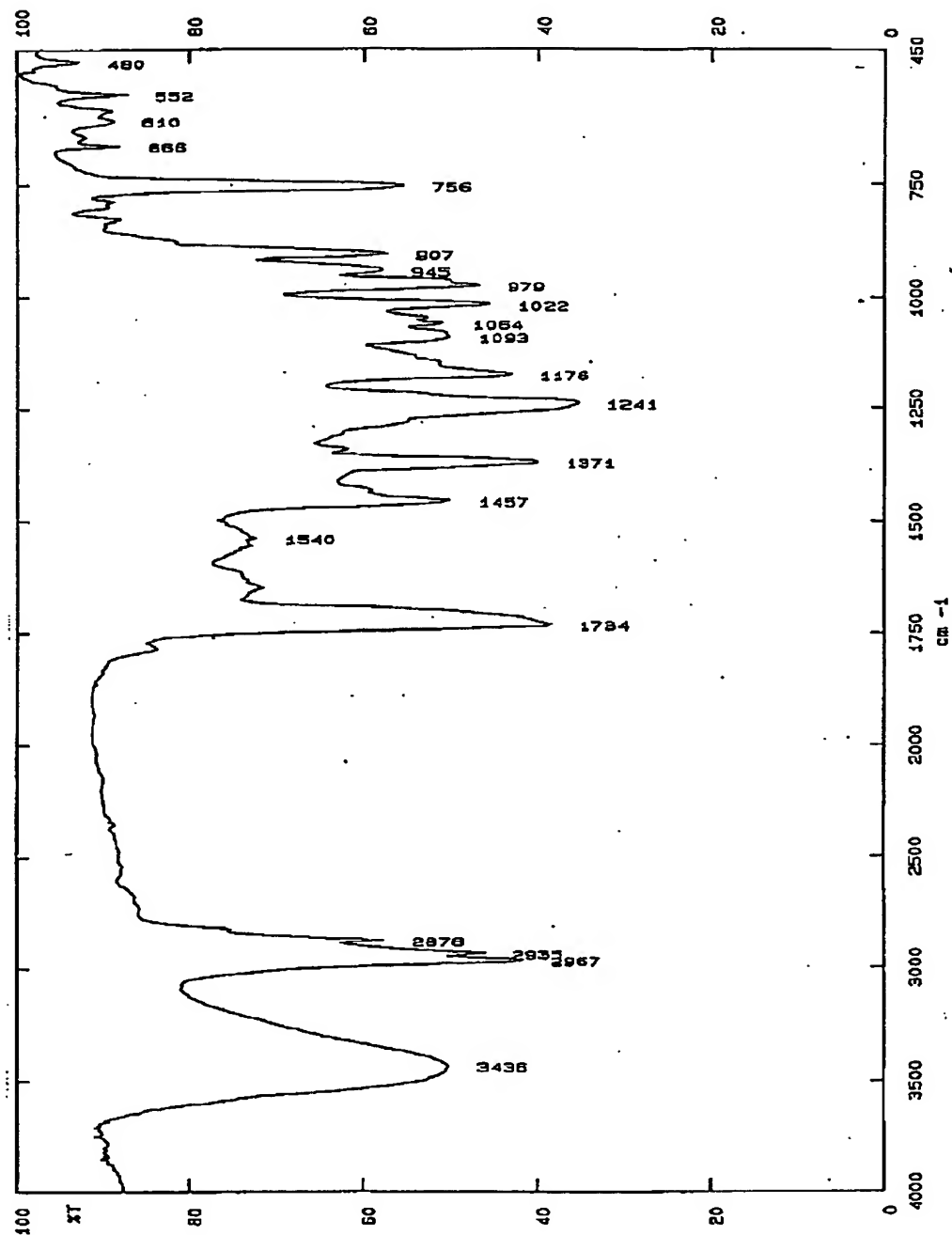
【図1】 KBr錠にて測定したFD-895の赤外線吸収スペクトルを示す。

【図2】 重クロロホルム中、400MHzで測定したFD-895の¹H-NMRスペクトルを示す。

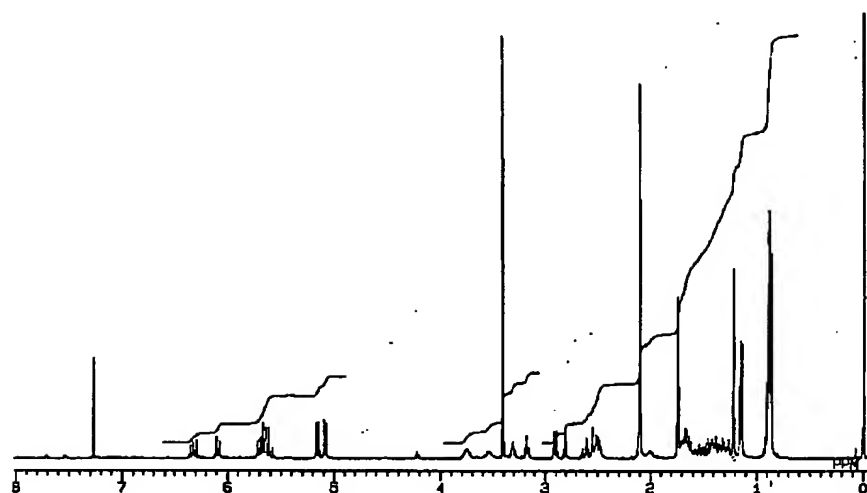
【図3】 第3図は重クロロホルム中、100MHzで測定したFD-895の¹³C-NMRスペクトルを示す。

す。

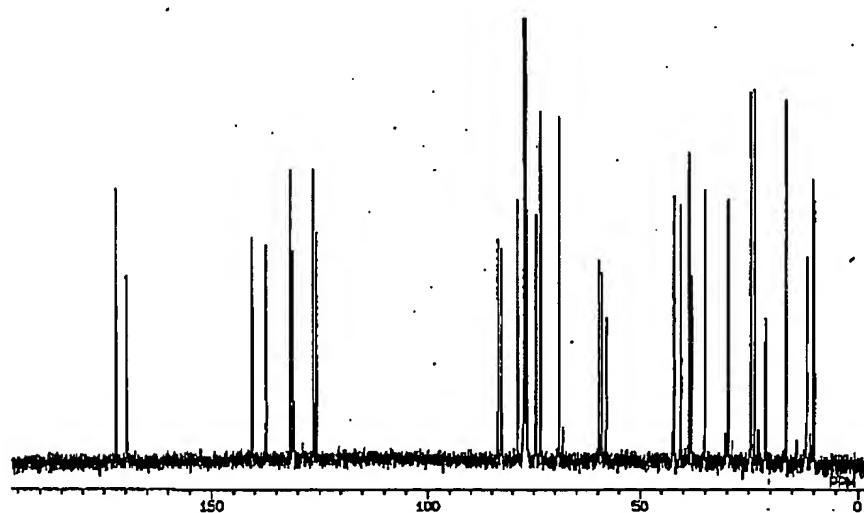
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 0 7 D 313:00)

(C 1 2 P 17/08

C 1 2 R 1:56)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

6701-4C

7804-4B

(72) 発明者 花田 和紀

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内